



İSTANBUL AKTARLARINDA SATILAN *HYPERICUM PERFORATUM* ÖRNEKLERİNİN FARMAKOGNOZİK AÇIDAN İNCELENMESİ

*PHARMACOGNOSTIC RESEARCH ON HYPERICUM PERFORATUM SAMPLES SOLD BY
HERBALISTS IN ISTANBUL*

Ömerül Faruk TAVLI¹, Ömer HAZMAN², Ahmet BÜYÜKBEN³, Fatma Nur YILMAZ⁴,
Berna ÖZBEK ÇELİK⁴, Esra EROĞLU ÖZKAN^{1*}

¹İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 34116, İstanbul, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, 03204,
Afyonkarahisar, Türkiye

³Afyon Kocatepe Üniversitesi, Çay Meslek Yüksek Okulu, Kimya Teknolojisi Programı, 03700,
Afyonkarahisar, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34116, İstanbul,
Türkiye

ÖZ

Amaç: Ülkemizde, halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bitkisel droglar genellikle aktarlardan temin edilmektedir. Aktarlarda satılan drogların kalitesi ve güvenilirliği uzun yıllardır tartışılmaktadır. Bu çalışma ile önemli tıbbi bitkilerimizden biri olan ve halk arasında yaygın olarak kullanılan *Hypericum perforatum* türünün İstanbul aktarlarından satın alınan örnekleri incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Sarı Kantaron adı ile satılan droglar, İstanbul'da faaliyet gösteren, rastgele seçilmiş 12 farklı aktardan temin edilmiştir. Bitkinin toplanan kısmının (drog) ve toplanma zamanının kontrolü makroskobik ve mikroskobik incelemelerle; saklama koşullarının uygunluğu ise mikrobiyolojik test ile araştırılmıştır. Drogların küllü ve nem miktarı, total antioksidan statü (TAS) ve total oksidan statü (TOS) değerleri, oksidatif stres indeksi (OSI), mineral ve ağır metal düzeyleri tespit edilmiştir. Droglardan hazırlanan metanol ekstrelerinin hiperisin içeriği Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile analiz edilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışma ile örneklerin çoğunun gözle görülebilen kirlilikler ile kontamine olduğu, 6 tanesinin hiperisin içermediği, 2 tanesinin çok yüksek oranda alüminyum (Al) içerdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak tıbbi bitkilerin gerekli denetimlere tabi tutulmadan aktarlarda satılmasının halk sağlığı açısından uygun

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Esra Eroğlu Özkan
e-posta / e-mail: eseroglu@istanbul.edu.tr, Tel. / Phone: +90 212 4400000/13582

olmadığı bir kez daha anlaşılmıştır. Mevcut bu durumun önüne geçilmesi, halkın doğru ve standart kalitede droglara ulaşabilmesi sağlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: ağır metal, aktarlar, halk sağlığı, hiperisin, *Hypericum perforatum*

ABSTRACT

Objective: In our country, herbal drugs used for medical purposes by the folk are generally purchased from the herbal stores. The quality and reliability of the plants sold in the herbal stores have been discussed for many years. The present study aims to investigate samples of *Hypericum perforatum*, which is one of the important medicinal plants and widely used by the folk.

Material and Method: The drugs sold as “St John’s Wort” were purchased from 12 different herbal stores which were randomly chosen in Istanbul. Quality control of the collected part and collection time of the plant were examined by using macroscopic and microscopic methods. The suitability of the plant storage conditions were investigated by microbiological test. The ash and moisture contents, total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), mineral and heavy metal levels of the plant were determined. Hypericin contents of the methanol extracts prepared from the plant samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Result and Discussion: In this study, it was determined that most of the samples were contaminated by impurities, 6 of them did not contain hypericin, and 2 of them contained high levels of aluminium (Al). As a result, it was once again understood that it might be inconvenient to sell the medicinal plants in the herbal stores unless inspected for public health. Sale of the medicinal plants in herbal stores should be prevented, and it should be ensured that the public can reach the high quality medicinal plants.

Keywords: heavy metal, herbalists, hypericin, *Hypericum perforatum*, public health

GİRİŞ

Günümüz modern tıbbında sentetik ilaçların yaygın kullanımına karşın halk arasında bitkisel drogların kullanımının tercih edildiği bilinmektedir. Özellikle endüstriyel olarak gelişmekte olan ülkelerde sentetik ilaçlara göre bitkisel drogların daha ucuz ve ulaşılabilir olmaları, geleneksel tedavide çok uzun yıllardır biliniyor olmaları, yan etki ve ilaç etkileşimlerinin sentetik ilaçlara göre daha az bilinir olması nedeniyle halk arasında yaygın olarak kullanıldıkları bir gerçektir [1-4].

Anadolu halkı, yaşadığı coğrafi bölgenin florasının zenginliği nedeniyle bitkiler ile yakından ilgili olmuştur. Kırsaldaki insanların doğadan topladığı, kentlerdekilerin ise aktarlardan temin ettiği bitkileri tıbbi amaçla kullandığı görülmektedir. Bitkilerin temin edildiği aktarların tarihi yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Osmanlı Dönemi’nde ilaç yapımında kullanılan bitkisel ve hayvansal kaynaklı hammaddeleri ve mineralleri (drog) satanlar için; Arapça “akkar” kelimesinden türeyen “aktar” kelimesi kullanılmıştır. Günümüzde de benzer dükkanlar için bu kelime kullanılmaya devam etmektedir [1].

Hypericum perforatum L.; Hypericaceae familyasına ait, yaklaşık olarak 30-100 cm boylarında çok yıllık otsu bir bitkidir. Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika’da geniş yayılış gösteren *H. perforatum* türünün taze ve çiçekli dallarından elde edilen “Hyperici herba” drogu Avrupa Farmakopesi’ne kayıtlıdır [5-7].

Anadolu’da; binbirdelik otu, kan otu, kılıç otu, koyun kıran, kuzu kıran, mayasıl otu, püren, sarı kantaron, yara otu, gibi isimlerle bilinen *H. perforatum* türünün; tarihçesi, etnobotanik kullanımı, kimyasal bileşimi ve aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır [8, 9].

Dünyada St. John's Wort olarak tanınan *H. perforatum* türünün tıbbi amaçla 2000 yılı aşkın süredir kullanıldığı bilinmektedir. Antik çağlarda doğaüstü özelliklere sahip olduğuna inanılan *H. perforatum* türünün cins ismi olan “*hypericum*”; Latince “hyper” ve “ikon” anlamına gelen kelimelerin birleşiminden oluşmuştur. Epiteti olan “*perforatum*” ise bitki ışığa tutulduğunda yaprak ve çiçeklerinde görülen saydam salgı bezlerinin oluşturduğu delikli görünümünden dolayı “delikli” anlamına gelen “perforated” kelimesinden türemiştir [3, 5, 10, 11].

Uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda *H. perforatum* bitkisinin kimyasal bileşimi aydınlatılmış; bitkinin, naftodiantron türevleri (hiperisin, psödohiperisin), flavonoidler (rutin, hiperozit, izokersitrin, kersitrin, luteolin, kempferol, mirsetin, amentoflavon ve I3, II8 biapigenin), floroglusinoller (hiperforin, adhiperforin), biflavonlar, prosiyanidinler, ksanton türevleri, tanenler, uçucu yağ bileşikler, fenolik asit türevleri, amino asitler, ayrıca; organik asitler, peptidler, polisakkaritler gibi hidrofilik maddeler ile bazı lipofilik maddeleri taşıdığı saptanmıştır [6, 10, 12, 13].

Aktarlardan alınan bitkisel droglar, teşhisi, standardizasyonu, toplama ve saklama koşulları gibi parametrelerde yeterli denetime tabi tutulmadıklarından halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadırlar. Birbirlerine benzer anatomiye sahip türlerin birbirlerinden ayırt edilmesi ve teşhisi oldukça önemli bir konudur. Bitkilerin toplanan kısmına, toplanma zamanına, kurutma ve saklama koşullarına göre kimyasal içeriği değişebilmektedir. Ayrıca, uygun olmayan saklama koşullarında bitkide mikrobiyolojik üreme de görülebilir. Bu nedenlerle, doğru bitkinin toplanması, toplanan kısmı, toplanma zamanı, teşhisi, kurutma ve saklama koşulları, tüm bunların denetlenmesi halk sağlığının korunması için çok önemli parametrelerdir ve uzman kişilerce yapılmalıdır.

Bu çalışma ile İstanbul'da faaliyet gösteren rastgele seçilmiş 12 aktardan, “Sarı Kantaron” olarak satılan örnekler temin edilmiştir, örneklerin doğru bitkiye ait olup olmadığını, drog olarak toplanan kısmının, toplama zamanının, kurutma ve saklama koşullarının uygunluğunu belirlemek amaçlanmıştır. Droglar üzerinde makroskobik ve mikroskobik incelemeler, mikrobiyolojik analiz, mineral ve ağır metal miktar tayini yapılmış, total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) belirlenmiştir, ayrıca droglardan hazırlanan metanol ekstralarında YPSK ile kalitatif hiperisin analizi yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Droglar

Bu çalışmada kullanılan Hyperici herba droğu, İstanbul'da faaliyet gösteren ve rastgele seçilmiş 12 aktardan, 20.11.2018- 15.03.2019 tarihleri arasında, “Sarı Kantaron” adı ile sorularak temin edildi. Droglar A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L olarak kodlandı.

Genel Metotlar

Makroskopik ve Mikroskopik İnceleme

12 farklı aktardan temin edilen Hyperici herba droğu örneklerinin makroskopik incelemesi, temiz bir süzgeç kağıdı üzerine yayılarak göz ile yapıldı, içeriğindeki yabancı maddeler tespit edildi, ayrıldı ve fotoğrafı çekildi [7].

Mikroskopik inceleme için, drog örnekleri blender (Waring) yardımıyla toz edildi ve 40 no'lu elekten geçirildi. Kloralhidrat ve sartur reaktifleri ile ayrı ayrı hazırlanan preparatları mikroskop (Olympus) aracılığıyla, 10x ve 40x ölçekli mercekler kullanılarak incelendi, polen ve hiperisin taşıyan salgı bezi arandı [7].

Mikrobiyal Üreme Testi

Mikrobiyal üreme testi için, drog örnekleri blender (Waring) yardımıyla toz edildi, 1 gram tartıldı ve 10 mL steril distile su ile karıştırıldı. Daha sonra steril tuzlu su kullanılarak on katlı seri dilüsyonları yapılarak 10^{-1} ve 10^{-8} 'lik örnekler elde edildi. Yapılan dilüsyonlardan 10 µl alınarak, bakteriler için Triptik Soy Agar (TSA) ve mantarlar için Saboroud Dekstroz Agar (SDA) katı besiyeri yüzeyine yayıldı ve etüvde bakteriler için 37 °C'de, mantarlar için 25 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Canlı total bakteri sayısını belirlemek için ertesi gün oluşan koloniler sayıldı ve seyreltme faktörü dikkate alınarak örneklerin bir gramında bulunan total aerob bakteri ve mantar sayıları koloni oluşturan birim (KOB) cinsinden hesaplandı [14].

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile Hiperisin Analizi

Örneklerden hazırlanan metanol ekstrelerindeki "hiperisin" varlığı YPSK ile belirlendi. SCL – 10A SHIMADZU cihazı (Pompa: LC – 10 AD; Enjektör: SIL – 10 AD; Dedektör: SPD – M10A; Kolon Fırını: CTO – 10AS) kullanıldı. Avrupa Farmakopesi'ndeki Hyperici herba drogunda hiperisin analizi için verilen izokratik metot uygulandı. Phenomenex 5 µm C18 (250 x 4,6 mm) kolon kullanıldı. Ekstreler ve hiperisin metanolde çözüldü, filtreden geçirilerek viallere alındı. Mobil faz (Etil asetat : 15,6 g/l sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (Fosforik asit ile pH 2) : Metanol (39:41:160)) karışımı 1 mL/dak akış hızıyla geçirildi. Enjeksiyon hacmi 10 µl; kolon sıcaklığı 40 °C, hiperisin için izlenen dalga boyu 590 nm olarak ayarlandı [15].

Ekstrelerin ve Örnek Çözeltilerin Hazırlanması

10 g drog 100 mL metanol (Merck 1.06007.2500) ile oda ısısında ve ışıktan korunarak 24 saat shaker (N-BIOTEK) aletinde maserasyona bırakıldı. Bu işlem aynı drog ile drog tamamen tüketilinceye kadar tekrar edildi. Maserat, rotary evaporatör (Buchi) ile 45 °C'yi geçmeyen ısıda alçak basınç altında

kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı. Droglardan bu şekilde hazırlanan ekstreler -20 °C’de muhafaza edildi [16, 17].

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Hiperisin (Fluka – 56690) metanol (Merck 1.06007.2500) ile çözüldü, uygun konsantrasyona seyreltildi ve 0,45 µm’lik filtrelerden süzülerek viallere alındı. Standart çözelti enjeksiyon öncesi taze olarak hazırlandı.

Nem ve Kül Miktar Tayini

Nem miktar tayini için; sabit vezne getirilmiş ve darası alınmış bir cam tartı kabı içine 2 gram kaba toz edilmiş drog konulup tam olarak tartıldı (P). Numune etüve yerleştirilip sıcaklık ve zaman ayarı yapılarak 105 °C sıcaklıkta sabit ağırlığa ulaşınca kadar (2-3 saat) kurutuldu. Bu sürenin sonunda kurutma kabı maşa ile tutularak desikatöre alındı. Desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra hassas terazide tartıldı. Tartım değerlerinden kuru madde ve nem miktarı hesaplandı. Kuru drogun ağırlığı (p) bulunduktan sonra aşağıdaki formüle göre drogdaki yüzde su miktarı hesaplandı [7, 18, 19].

$$\% \text{ su} = (P-p)/P \times 100$$

Kül miktar tayini için; 1 gram drog sabit ağırlığa getirilmiş ve darası alınmış bir porselen krozede tam olarak tartıldı. Önce düşük ısıda (300 °C) daha sonra 800 °C’yi geçmeyen bir ısıda 45 dakika yakıldı. Elde edilen külün numune miktarına oranlanması ile yüzde kül miktarı hesaplandı [7, 19, 20].

Total Antioksidan Statü (TAS), Total Oksidan Statü (TOS) ve Oksidatif stres indeksinin (OSI) ve Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Drog örneklerinin TAS, TOS analizleri için hazırlanması

Hyperici herba droglarında TAS ve TOS değerlerini belirlerken ham örnekler kullanıldı. Bu amaçla toz haline getirilmiş bitkinin yaprak, dal ve çiçek bölümleri iyice karıştırıldıktan sonra 1 g tartılarak bir tüpe kondu. Üzerine 1:10 (w/v) oranında buz soğukluğunda PBS (pH:7,4) eklendi. Vorteks ile karıştırılarak buz içinde 10 kez sonikasyona tabi tutuldu. Her bir sonikasyon 20 saniye süreyle uygulandıktan sonra 1 dakika sonikatör (Bandelin, UW 2070) dinlendirildi. Böylelikle bitkinin hücresel boyutta da iyice parçalanarak örneklerin daha da homojen hale gelmesi hedeflendi. Sonikasyonla oluşan PBS-bitki süspansiyonu santrifüj edilerek örneklere ait süpernatantlar elde edildi. Bu şekilde her bir ham örnekten 3 adet temsili örnek hazırlandı. TAS, TOS analizlerinde hazırlanan bu temsili örnekler kullanıldı [21].

Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeylerinin Belirlenmesi

Farklı aktarlardan alınan Hyperici herba droglarından hazırlanan temsili örneklerde TAS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kit (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Yapılan analizlerde kör olarak PBS kullanıldı. Örneklerdeki TAS seviyeleri, vitamin E'nin suda çözünür bir formu olarak kabul edilen troloks ile kıyaslama yapılarak tespit edildi. Böylelikle numunelerdeki total antioksidan miktarı troloks eşdeğeri (ekivalan) şeklinde belirlendi. TAS seviyeleri belirlenirken troloks antioksidanı ile farklı konsantrasyonlarda (2, 1, 0.5 mmolTroloks/L) hazırlanan standartlar kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak bitki süpernatantlarında TAS seviyeleri belirlendi. TAS düzeyleri mmolTroloks Ekivalan/L olarak ifade edildi [21].

Total Oksidan Statü (TOS) Düzeylerinin Belirlenmesi

Bir bitkide olan oksidan moleküllerin seviyelerinin belirlenmesi, o türün antioksidan olarak etkinliğini açıklamak adına yararlı olabilmektedir. Ayrıca fitoterapötik amaçla kullanılacak olan bitkilerin TOS düzeylerinin yüksek olması, bitkiden sağlanması düşünülen antioksidatif faydanın azalacağı anlamına gelmektedir. Bu bağlamda sunulan çalışmada total antioksidan kapasite (TOS) belirlenmiştir. TOS seviyeleri belirlenirken standart olarak 20 µmol/L hidrojenperoksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Bitkideki total antioksidan miktarı H₂O₂ ile kıyaslama yapılarak bulunduğu için sonuçlar H₂O₂ eşdeğeri (ekivalan) olarak belirlenmiştir. Bulunan TOS sonuçları ise hidrojenperoksit ekivalan litre (µmol H₂O₂ ekivalan/L) olarak ifade edildi.

Bitki örneklerinin sonikasyonu sonrasında elde edilen süpernatantlardan alınan uygun miktardaki hacim üzerine kit protokolüne uygun reaktifler katıldıktan sonra yapılan spektrofotometrik okuma (540 nm) sonucunda elde edilen optik dansitelerden hareketle numunelerdeki TOS seviyeleri belirlendi. TOS seviyeleri analizinde kullanılan ticari kitte (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) belirtilen ve aşağıda sunulan formül aracılığı ile hesaplandı [21].

$$\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Ekivalan/L}) = [(\Delta\text{Abs Sample}/\Delta\text{Abs standart}) \times 20]$$

Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Belirlenmesi

Analizlerden elde edilen TAS ve TOS verileri kullanılarak hesaplanan oksidatif stres indeksi (OSI) kit protokollerinde (Rell Assay) ifade edildiği gibi, aşağıda verilen formül yardımıyla hesaplandı. Elde edilen OSI değerleri, OSI seviyeleri düşük olan örneğin fitoterapötik etkinliğinin daha yüksek olabileceği şeklinde değerlendirildi [22].

$$\text{OSI}=[(\text{TOC}/\text{TAC}) \times 100]$$

Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Hyperici herba droglarındaki organik bileşenleri bozundurmamak, inorganik bileşenleri ise çözünür forma dönüştürmek amacıyla mikrodalga fırında yakma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 0.5 g ham örnek teflon godelere alındı. Numune üzerine 3 mL nitrik asit, 1 mL hidrojen peroksit ve 0.5 mL perklorik asit eklendi. Teflon godelerin kapağı kapatıldı. Mikrodalga fırına (Berghof, Speedwave Two) yerleştirilerek ısıtıldı. Mikrodalga fırın içinde godeler 75 °C/5 dak, 160 °C/15 dak, 75°C/5 dak tutuldu. Fırından çıkan godeler oda sıcaklığına geldikten sonra örnekler 10 mL'lik balon jodelere aktarıldı. 18.2 MΩxcm ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak balon jodelere alınan örneklerdeki minör ve major element konsantrasyonları Endüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES; Spectro Genesis, Germany) cihazı kullanılarak ölçüldü. Metot kalibrasyonu için çoklu element standartları (Merck, ICP multi-element standart solution XVI; Merck, ICP multi-element standart solution IV) kullanıldı. Standartlarda bulunan elementlere (Sb, As, Be, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Tl, Ti, V, Zn, Ag, Al, B, Ba, Bi, Ga, In, K) ait kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Sonrasında mikrodalga fırında yaş yakma metodu ile yakılan örneklerdeki element düzeyleri belirlendi. Örneklerde varlığı tespit edilebilen element düzeyleri mg/L (ppm) şeklinde ifade edildi [23].

İstatistiki değerlendirme

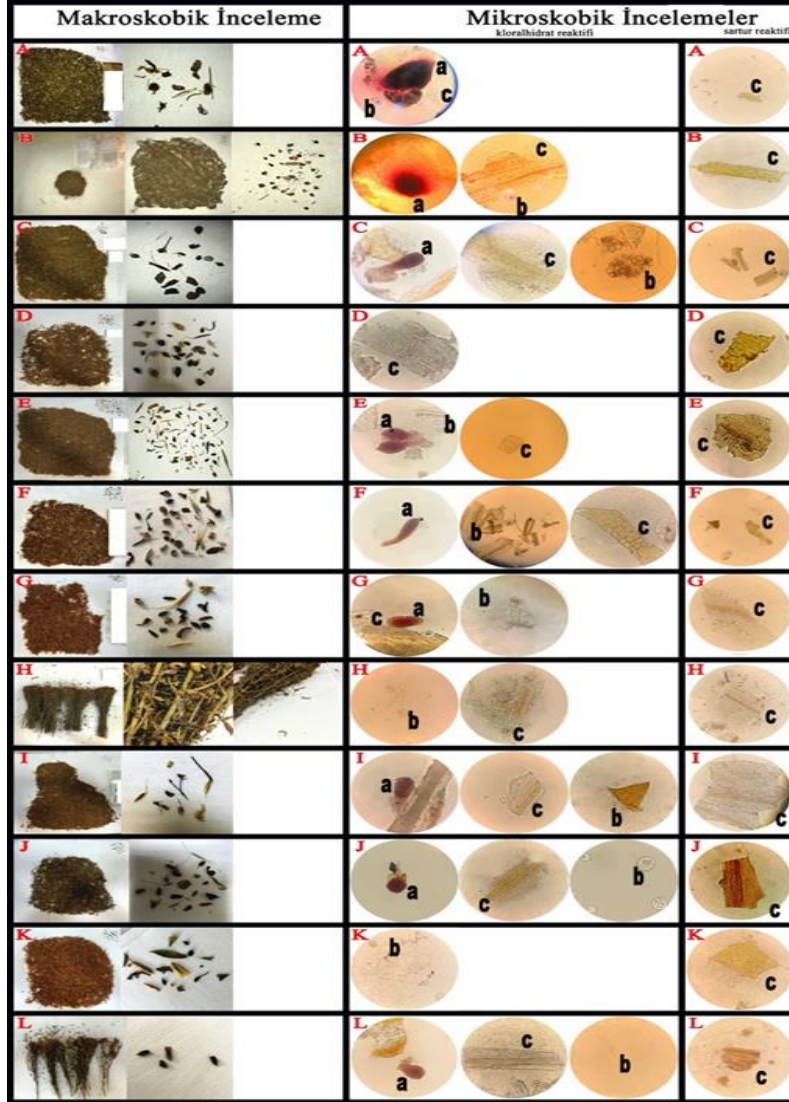
Elde edilen veriler ortalama±standart sapma şeklinde tanımlandı. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 18 paket program kullanıldı. Farklı aktarlardan tedarik edilen Hyperici herba droglarındaki TAS, TOS, OSİ ve element düzeyleri arasındaki istatistiki farklılıklar ($p<0.05$) tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak belirlendi. İstatistiki farklılıkların olduğu belirlenen parametrelerde hangi bitki türleri arasında istatistiki düzeyde anlamlı fark olduğu ise Duncan post testi kullanılarak tespit edildi ($p<0.05$). Analizi yapılan bir parametrede bitki numuneleri arasındaki kıyaslamalar sonucu olarak ortaya çıkan istatistiki farklılıklar üst simge (^{a, b, c, ...}) halinde verilerin sağ üst kısmında gösterildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Makroskobik ve Mikroskobik İnceleme Sonuçları

Yapılan makroskobik inceleme sonucunda; A, F ve G örneklerinin küflenmiş; C ve H örneklerinin böceklenmiş olduğu; A, C, D, E, F, G, I, J ve K örneklerinin bitkinin meyve durumlarını içerdiği (önceki yıldan kalma meyveli dallar); A, D, E, F, G, I, J ve K örneklerinin farklı bitkilere ait parçalar içerdiği; A, B, C, G, J, K ve L örneklerinin taş parçaları içerdiği saptanmıştır (Şekil 1).

Yapılan mikroskobik incelemede; kloralhidrat reaktifi ile incelenen A, B, C, E, F, G, I, J ve L örneklerinde hiperisin taşıyan salgı bezi görülürken, D, H ve K örneklerinde rastlanmamıştır. Tüm örneklerde polen görülmüştür. Buna ek olarak örneklerdeki odun borusu hem kloralhidrat reaktifi ile hem de Sartur reaktifi ile incelenmiştir (Şekil 1).



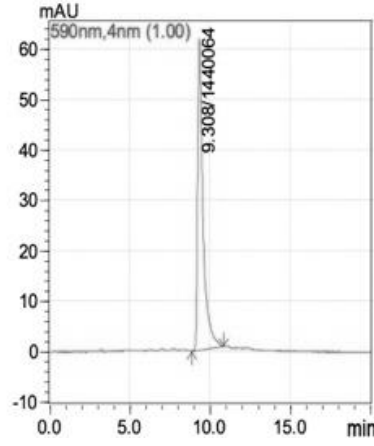
Şekil 1. Örneklerin makroskobik ve mikroskobik görüntüsü. a: hiperisin taşıyan salgı bezi; b: polen hücresi; c: odun borusu

Mikrobiyal Üreme Testi

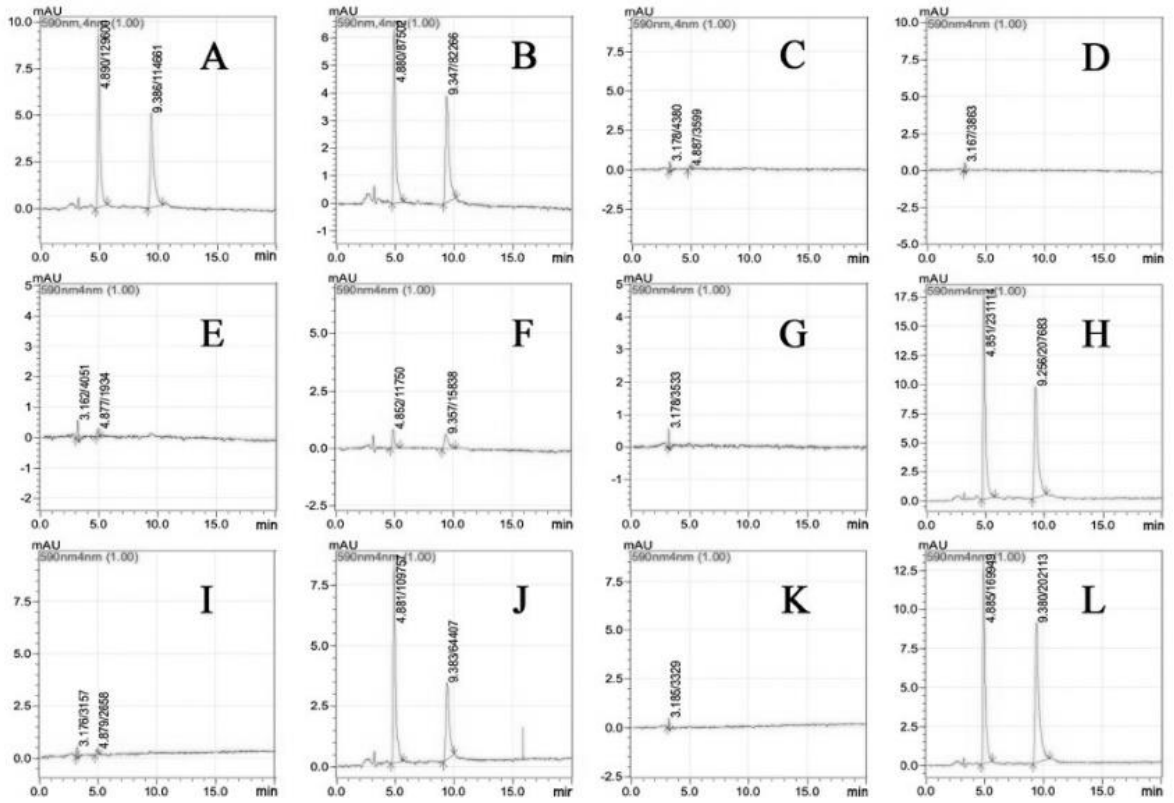
Yapılan test sonuçlarında TSA ve Saboroud besiyerlerinde mikroorganizma üremesine rastlanmamıştır. Bu durumun test edilen bitkisel drogların antimikrobiyal etkisinden kaynaklanabileceği ya da olası bir koruyucu maddenin depolanma süresini uzatmak amacıyla bitkisel droglara ilave edildiği şeklinde yorumlanmıştır [14].

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Hiperisin Analizi Sonuçları

Hiperisin standardının retansiyon zamanı 9.3 dak olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Örnekler ait ekstraktların içeriğinde hiperisin varlığı bu retansiyon zamanı ve hiperisinin (PDA) kromatogramı esas alınarak kalitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. Hiperisin standardına ait PDA kromatogramı (Hiperisin standardına ait retansiyon zamanı: 9.308 dak)



Şekil 3. Örneklere ait PDA kromatogramı (Örneklere ait retansiyon zamanları; A için 9,386 dk.; B için 9,347 dk.; C için tespit edilemedi; D için tespit edilemedi; E için tespit edilemedi; F için 9,357 dk.; G için tespit edilemedi; H için 9,256 dk.; I için tespit edilemedi; J için 9,383 dk.; K için için tespit edilemedi; L için 9,380 dk. olarak hesaplanmıştır.)

Kül ve Nem Miktar Tayini Sonuçları

Yapılan analiz sonucunda elde edilen veriler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kül ve nem miktar tayini sonuçları

ÖRNEK	KÜL MİKTAR TAYİNİ SONUCU	NEM MİKTAR TAYİNİ SONUCU	ÖRNEK	KÜL MİKTAR TAYİNİ SONUCU	NEM MİKTAR TAYİNİ SONUCU
A	%3,66	%8,55	G	%6,28	%7,87
B	%7,48	%17,02	H	%4,13	%7,74
C	%6,81	%8,70	I	%5,58	%7,58
D	%7,12	%7,95	J	%5,44	%7,61
E	%5,87	%8,10	K	%6,52	%7,97
F	%4,95	%7,82	L	%3,18	%7,49

Total Antioksidan Statü (TAS), Total Oksidan Statü (TOS) ve Oksidatif stres indeksinin (OSI) ve Mineral Madde Düzeylerinin Belirlenmesi

Elde edilen bulgular farklı aktarlardan alınan 12 farklı Hyperici herba drogunun TAS düzeyleri arasında istatistiki farklılık olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte bir bitkideki oksidan madde miktarının göstergesi olarak ifade edilebilecek TOS düzeylerinde ise istatistiki düzeyde farklılıklar olduğu söylenebilir (Tablo 2). Fitoterapötik bitkilerde her ne kadar antioksidan etkili bileşikler bulunsa da, stres oluşturabilecek oksidanlar da belirli miktarda bulunmaktadır. Fitoterapötik amaçla kullanılacak olan bitkide oksidan madde seviyelerinin az olması, bitkinin fitoterapötik amaçla kullanan organizma tarafından kolayca tolere edilebilmesini sağlar. Bu da bitki türlerinin antioksidan etkili bileşenlerinin etkilerinin daha güçlü bir şekilde ortaya çıkması açısından önemlidir.

Tablo 2. Örneklerin TAS, TOS, OSI seviyeleri

Örnek	TAS (mmol Troloks Ekvivalent/L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Ekvivalent/L)	OSI (keyfi birim)
A	2,39 \pm 0,04	88,62 \pm 3,48 ^e	3718,33 \pm 193,35 ^e
B	2,34 \pm 0,09	200,51 \pm 7,86 ^f	8562,47 \pm 43,20 ^g
C	2,37 \pm 0,08	33,64 \pm 6,08 ^a	1418,47 \pm 222,95 ^{a,d}
D	2,20 \pm 0,15	76,10 \pm 3,92 ^d	3469,51 \pm 190,77 ^e
E	2,22 \pm 0,18	93,90 \pm 4,50 ^e	4249,03 \pm 490,29 ^f
F	2,30 \pm 0,03	41,85 \pm 0,31 ^a	1824,46 \pm 35,43 ^{a,b}
G	2,21 \pm 0,05	71,28 \pm 5,42 ^{b,c,d}	3229,04 \pm 294,21 ^{c,d}
H	2,27 \pm 0,05	33,74 \pm 0,58 ^a	1486,58 \pm 28,20 ^{a,b}
I	2,29 \pm 0,04	74,00 \pm 10,27 ^{c,d}	3237,67 \pm 462,41 ^{c,d}
J	2,26 \pm 0,08	43,85 \pm 4,27 ^a	1940,49 \pm 196,92 ^b
K	2,28 \pm 0,04	63,03 \pm 8,92 ^b	2758,20 \pm 369,60 ^c
L	2,32 \pm 0,08	65,64 \pm 1,86 ^{b,c}	2839,32 \pm 115,65 ^c
p	0,23	0,000	0,000

Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3).

a,b,c,d,e,f,g :Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05).

OSI değerleri de TOS düzeyleri yüksek olan bitki örneklerinde istatistiki olarak farklı bulunmuştur. C, F, H ve J örneklerinin TOS ve OSI değerleri diğer örneklere oranla düşük bulunmuştur. Bu nedenle bu örneklerin fitoterapötik kullanımından beklenen olası fayda düzeyi daha yüksek olacaktır. Özellikle A, B ve E örneklerinde ise TOS düzeylerinin dolayısı ile OSI düzeylerinin diğer örneklere göre istatistiki düzeyde yüksek çıktığı ve bu nedenle bu örneklerin fitoterapötik kullanımından beklenen olası fayda düzeyinin düşük olabileceği düşünülebilir.

Gerçekleştirilen element analizleri sonucunda deteksiyon limiti üzerinde tespit edilebilen elementler Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterilmiştir. Tüm örneklerde 10 elementin (Ca, Cu, Li, Mg, Mn, Sr, Ti, V, Zn, K) farklı konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 4). 4 element (Cd, Cr, Ni, Al) ise bazı örneklerde var olduğu tespit edilirken bazı numunelerde ise olmadığı veya varsa bile dedeksiyon limitinin altında kaldığı belirlenmiştir (Tablo 5). Örneklerde analizi gerçekleştirilen 15 elementin (Sb, As, Be, Co, Fe, Pb, Mo, Se, Tl, Ag, B, Ba, Bi, Ga, In) ise örneklerde olmadığı veya varsa bile dedeksiyon limitinin altında kaldığı görülmüştür.

Cu, Mn ve Zn elementleri canlı vücudunda pek çok önemli biyolojik işlevleri yerine getiren eser elementlerdendir. Cu ve Zn çoğunlukla sitozolde bulunan süperoksit dismutaz (SOD1) enziminin bileşenleri iken, Mn ise mitokondriyal süperoksit dismutazın (SOD2) bir bileşenidir. Her iki enzim de oksidan/antioksidan dengenin korunmasında görev almaktadır. Cu ayrıca kemik oluşumunda Ca elementine destek olurken, demir metabolizmasında ve sentezinde rol oynamakta, sinir sisteminin düzgün olarak çalışmasında da etkisi bulunmaktadır. Zn antioksidan fonksiyonuna ek olarak endokrin sistemin düzgün çalışmasına pozitif olarak etki etmekte, özellikle tiroid ve pankreas hormonlarının metabolizmasında çeşitli görevler almaktadır. J örneğinin Mn düzeyinin diğer tüm örneklerden, yine aynı örneğin Zn seviyesinin (en yüksek Zn derişimi) diğer pek çok örnekten anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir. H örneğinin ise pek çok diğer bitki örneği ile anlamlı bir fark bulundurmamasına rağmen en yüksek Cu derişimine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu örneğe ait Zn ve Mn düzeylerinin diğer pek çok örnekten daha yüksek olduğu belirlenmiştir. TOS ve OSI değerlerine paralel olarak H ve J örneklerinin fitoterapideki etkilerinin eser element temelinde de gerçekleşebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca aynı örneklerin Al konsantrasyonlarının düşük olması, Cd seviyelerinin ve diğer ağır metallere ait derişimlerin dedeksiyon limitinin altında olması bu elementlerden kaynaklanabilecek ağır metal toksisite riskinin daha az olabileceğini de göstermektedir. B ve C örneklerine ait Al seviyesinin diğer drog örneklerinden çok daha fazla olduğu belirlenmiştir ve bu drogların uzun süreli kullanımının ağır metal toksikasyonuna neden olabileceği düşünülmektedir [24-27].

İstanbul aktarlarından alınan 12 farklı *Hypericum perforatum* örneği üzerinde yapılan makroskobik inceleme ile neredeyse tamamında gözle görülür kontaminasyona rastlandığı, bazılarının böceklenmiş olduğu, dolayısıyla drogların doğru şekilde toplanıp saklanmadığı anlaşılmıştır. Örneklerden 6 tanesinin meyveli bitkiden oluşması nedeniyle drogun yanlış zamanda toplandığı

saptanmıştır. Mikrobiyolojik analiz sonucunda besiyerinde üreme tespit edilememiştir. Bu sonuç bitkisel drogların antimikrobiyal etkisinden kaynaklanabileceği gibi, depolanma süresini uzatmak amacıyla olası bir koruyucu maddenin ilave edilme olasılığını da düşündürmektedir. Hiperisin taşıyan salgı bezlerinin mikroskopik incelemeyle görülmediği örneklerde, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile hiperisin tespit edilememiştir. Hiperisin, 12 örneğin yalnızca 6'sında saptanabilmiştir (Tablo 3). İki örneğin Al seviyesinin çok fazla olması bu drogların uzun süreli kullanımının ağır metal toksikasyonu ile sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte aynı türe ait örneklerde TAS, TOS düzeylerinin, ağır metal ve mineral içeriğinin farklılığı, bitki türlerinin farklı bölgelerden toplanmış olması, toplanma dönemi, toplama sonrası kurutulma sürecinde yapılan muhtemel farklı uygulamalar, saklama koşullarının farklılığı gibi nedenlerle açıklanabilir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma ile aktarlardan temin edilen ve analizleri yapılan drog örneklerinin standart bir kalitede olmadığı belirlenmiştir. İnsan sağlığı açısından tehdit oluşturan bu durumun önüne geçilmesi için gerekli denetimlerin yapılması ve halk sağlığının korunması adına uygun olmayan drogların satışına izin verilmemesi gerekmektedir. Halkın doğru ve kaliteli droglara ulaşabilmesi sağlanmalıdır.

Tablo 3. Makroskopik, mikroskopik inceleme ve YPSK ile hiperisin analizi sonuçları

Örnek	Mikroskopik İnceleme (Kloralhidrat ile)		YPSK ile Kalitatif Hiperisin Analizi
	Hiperisin Taşıyan Salgı Bezi	Polen	
A	+	+	+
B	+	+	+
C	+	+	-
D	-	+	-
E	+	+	-
F	+	+	+
G	+	+	-
H	-	+	+
I	+	+	-
J	+	+	+
K	-	+	-
L	+	+	+

Tablo 4. Örneklerin element seviyeleri-1

Örnek	Ca (ppm)	Cu (ppm)	K (ppm)	Li (ppm)	Mg (ppm)	Mn (ppm)	Sr (ppm)	Ti (ppm)	V (ppm)	Zn (ppm)
A	119,13 ± 15,35 ^a	9,41 ± 0,95 ^{a,b,c,d}	93,74 ± 5,02 ^a	1,85 ± 0,95 ^a	78,16 ± 3,20 ^c	70,24 ± 2,60 ^d	22,97 ± 2,28 ^{a,b}	8,02 ± 7,89 ^{a,b}	1,30 ± 1,13 ^a	44,94 ± 15,80 ^{a,b}
B	254,59 ± 3,65 ^e	8,08 ± 0,37 ^a	152,18 ± 2,49 ^{b,c,d}	5,58 ± 0,12 ^b	49,84 ± 1,0 ^b	24,16 ± 0,06 ^a	132,54 ± 2,43 ^e	20,64 ± 0,71 ^c	4,41 ± 0,02 ^d	28,87 ± 8,53 ^a
C	208,95 ± 11,80 ^{b,c,d,e}	8,61 ± 0,41 ^{a,b}	121,16 ± 8,12 ^{a,b,c}	4,94 ± 0,50 ^b	43,55 ± 3,41 ^{a,b}	39,13 ± 2,69 ^c	36,23 ± 1,98 ^{b,c}	30,37 ± 2,01 ^d	2,82 ± 0,12 ^{b,c}	42,86 ± 1,38 ^{a,b}
D	243,53 ± 0,44 ^{d,e}	8,14 ± 0,27 ^a	158,83 ± 3,23 ^{c,d}	2,52 ± 0,25 ^a	38,97 ± 2,74 ^{a,b}	29,92 ± 2,25 ^{a,b}	46,20 ± 1,38 ^c	6,43 ± 1,26 ^{a,b}	2,70 ± 0,19 ^{b,c}	33,07 ± 15,92 ^a
E	235,07 ± 12,61 ^{d,e}	9,55 ± 0,66 ^{a,b,c,d}	145,28 ± 8,75 ^{b,c,d}	2,51 ± 0,16 ^a	31,72 ± 0,62 ^{a,b}	42,38 ± 0,38 ^c	25,45 ± 0,55 ^{a,b}	12,00 ± 2,56 ^b	2,88 ± 0,01 ^{b,c}	33,03 ± 1,96 ^a
F	179,89 ± 1,95 ^{a,b,c,d}	10,00 ± 0,54 ^{a,b,c,d}	122,46 ± 2,90 ^{a,b,c}	2,42 ± 0,24 ^a	38,09 ± 3,80 ^{a,b}	37,43 ± 2,16 ^{b,c}	27,65 ± 1,43 ^{a,b}	9,35 ± 1,29 ^{a,b}	2,42 ± 0,10 ^{a,b,c}	30,23 ± 1,63 ^a
G	236,92 ± 4,33 ^{d,e}	12,42 ± 0,37 ^{c,d}	161,62 ± 4,34 ^d	2,33 ± 0,12 ^a	31,58 ± 0,59 ^{a,b}	22,75 ± 0,45 ^a	35,29 ± 0,72 ^{b,c}	7,31 ± 1,07 ^{a,b}	3,21 ± 0,05 ^c	42,37 ± 0,76 ^{a,b}
H	137,03 ± 8,94 ^{a,b}	12,54 ± 0,08 ^d	114,65 ± 4,23 ^{a,b}	1,49 ± 0,19 ^a	48,33 ± 7,43 ^{a,b}	43,60 ± 3,87 ^c	17,71 ± 0,63 ^a	5,66 ± 0,66 ^{a,b}	2,01 ± 0,07 ^{a,b,c}	44,50 ± 3,11 ^{a,b}
I	219,78 ± 13,64 ^{c,d,e}	11,21 ± 0,89 ^{a,b,c,d}	140,99 ± 8,53 ^{b,c,d}	1,99 ± 0,20 ^a	26,87 ± 2,88 ^a	37,75 ± 2,39 ^{b,c}	26,77 ± 1,39 ^{a,b}	9,77 ± 0,69 ^{a,b}	2,75 ± 0,18 ^{b,c}	36,13 ± 8,75 ^a
J	184,21 ± 17,33 ^{a,b,c,d,e}	9,17 ± 1,04 ^{a,b,c}	124,56 ± 8,72 ^{a,b,c,d}	2,44 ± 0,27 ^a	34,32 ± 10,50 ^{a,b}	114,91 ± 12,64 ^e	59,97 ± 7,10 ^d	9,41 ± 0,88 ^{a,b}	2,84 ± 0,20 ^{b,c}	53,98 ± 7,87 ^b
K	193,14 ± 90,31 ^{b,c,d,e}	9,17 ± 3,54 ^{a,b,c}	149,86 ± 51,62 ^{b,c,d}	2,48 ± 1,29 ^a	38,79 ± 30,67 ^{a,b}	30,29 ± 7,16 ^{a,b}	32,16 ± 18,32 ^{a,b,c}	9,05 ± 6,42 ^{a,b}	2,77 ± 1,62 ^{b,c}	30,29 ± 6,05 ^a
L	150,12 ± 90,12 ^{a,b,c}	11,62 ± 4,31 ^{b,c,d}	119,74 ± 39,33 ^{a,b}	1,65 ± 1,24 ^a	49,34 ± 21,44 ^{a,b}	26,72 ± 3,54 ^a	22,64 ± 19,45 ^{a,b}	3,97 ± 3,11 ^a	1,66 ± 1,13 ^{a,b}	36,06 ± 10,45 ^a

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3).

a,b,c,d,e :Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$). Numunelerde analizi gerçekleştirilen 15 elementin (Sb, As, Be, Co, Fe, Pb, Mo, Se, Tl, Ag, B, Ba, Bi, Ga, In) ise numunelerde olmadığı veya varsa bile deteksiyon limitinin altında kaldığı belirlenmiştir.

Tablo 5. Örneklerin element seviyeleri-2

Örnek	Al (ppm)	Cd (ppm)	Cr (ppm)	Ni (ppm)
A	3,27 ± 4,77	-	-	1,73 ± 1,19
B	24,97 ± 2,05	-	1,66 ± 0,15	3,18 ± 0,21
C	20,88 ± 1,41	2,01 ± 0,13	1,51 ± 0,08	1,43 ± 0,27
D	3,32 ± 1,23	-	-	2,60 ± 0,35
E	6,97 ± 1,71	0,48 ± 0,04	0,63 ± 0,13	2,25 ± 2,11
F	6,74 ± 1,81	-	-	-
G	2,84 ± 0,41	0,75 ± 0,09	1,54 ± 0,20	3,34 ± 0,46
H	1,83 ± 0,61	-	0,52 ± 0,04	1,11 ± 0,13
I	2,99 ± 0,30	-	0,58 ± 0,09	0,75 ± 0,08
J	3,87 ± 0,88	-	0,48 ± 0,01	0,82 ± 0,09
K	7,44 ± 1,24	-	0,81 ± 0,18	1,08 ± 0,04
L	-	-	-	0,74 ± 0,18

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=3). Numunelerde analizi gerçekleştirilen 15 elementin (Sb, As, Be, Co, Fe, Pb, Mo, Se, Tl, Ag, B, Ba, Bi, Ga, In) ise numunelerde olmadığı veya varsa bile deteksiyon limitinin altında kaldığı belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamız, konunun önerilmesinden tezin sonuçlanmasına kadar Sevgili Hocamız Prof. Dr. Afife MAT'ın desteğiyle yürütülmüştür. Hocamıza, bilimsel ve manevi katkılarından ötürü çok teşekkür ediyor, bilgi birikiminden ve tecrübelerinden birçok öğrencinin faydalanacağı güzel bir emeklilik hayatı diliyoruz.

KAYNAKLAR

1. Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, p. 13-62.
2. Baytop, T. (2001). Türk Eczacılık Tarihi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, p. 9-29.
3. Eroğlu Özkan, E. (2011). Drosanthe ve Taeniocarpium Seksiyonlarına ait bazı endemik *Hypericum* türlerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivite yönünden incelenmesi. (Doktora). İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
4. Verpoorte, R. (2009). Medicinal plants: a renewable resource for novel leads and drugs In Ramawat, K.G., Sukhadia, M.L. (Eds.), Herbal drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine (pp. 1-5). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
5. Bilia, A.R., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2002). St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*, 70(26), 3077-3096.
6. Patocka, J. (2003). The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine*, 1(2), 61-70.
7. European Pharmacopoeia (7th edition) (2011). St. John's Wort (*Hyperici herba*), volume 1, 1241-1244. Council of Europe, Strasbourg, France.

8. Baytop, T. (1980). Farmakognozi Ders Kitabı, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, p. 202.
9. Baytop, T. (2007). Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, Ankara, p. 152.
10. Hostettmann, K., Wolfender, J.L. (2005). Phytochemistry. In Müller, W.E. (Ed.), St. John's Wort and its active principles in depression and anxiety. Frankfurt: Birkhäuser Verlag.
11. Robson, N.K.B. (2003). Hypericum botany. In Ernst, E. (Ed.), Hypericum–The genus Hypericum (pp. 1–22). London, New York: Taylor and Francis.
12. Greeson, J.M., Sanford, B., Monti, D.A. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum*): A review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 153(4), 402-414.
13. Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (2007). St John's Wort. In Barnes, J., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (Eds.), Herbal Medicines (3. Baskı ed.). London: Pharmaceutical Press.
14. Harrigan, W.F., McCance, M.E. (2014). Laboratory Methods In Microbiology, Academic Press, p. 1-374.
15. Ozkan, E.E., Ozden, T.Y., Ozsoy, N., Mat, A. (2018). Evaluation of chemical composition, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of *Hypericum neurocalycinum* and *Hypericum malatyanum*. *South African Journal of Botany*, 114, 104-110.
16. Radulović, N., Stankov-Jovanović, V., Stojanović, G., Šmelcerović, A., Spiteller, M., Asakawa, Y. (2007). Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chemistry*, 103(1), 15-21.
17. Trovato, A., Raneri, E., Kouladis, M., Tzakou, O., Taviano, M.F., Galati, E.M. (2001). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Hypericum empetrifolium* Willd. (Guttiferae). *Il Farmaco*, 56(5-7), 455-7.
18. European Pharmacopoeia (7th edition) (2011). Loss on Drying, volume 1, 51. Council of Europe, Strasbourg, France.
19. Council of Europe. (2007). Guide for the Elaboration of Monographs on Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations, 13-14. Strasbourg, France.
20. European Pharmacopoeia (7th edition) (2011). Total Ash, volume 1, 118. Council of Europe, Strasbourg, France.
21. Hazman, Ö., Aksoy, L., A, B. (2016). Effects of crocin on experimental obesity and type-2 diabetes. *Turkish Journal of Medicinal Sciences*, 46(5), 1593-1602.
22. Hazman, Ö., Bozkurt, M.F. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activities of safranal in the reduction of renal dysfunction and damage that occur in diabetic nephropathy. *Inflammation*, 38(4), 1537-1545.

23. Cemek, M., Büyükokuroğlu, M.E., Hazman, Ö., Bulut, S., Konuk, M., Birdane, Y. (2011). Antioxidant enzyme and element status in heroin addiction or heroin withdrawal in rats: effect of melatonin and vitamin E plus Se. *Biological Trace Element Research*, 139(1), 41-54.
24. Baltacı, A.K., Mogulkoc, R., Baltacı, S.B. (2019). The role of zinc in the endocrine system. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(1), 231-239.
25. Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., Kocot, J. (2014). The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals*, 27(4), 611-621.
26. Li, L., Yang, X. (2018). The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
27. Olechnowicz, J., Tinkov, A., Skalny, A., Suliburska, J. (2018). Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(1), 19-31.